

膠囊錠狀食品中蝦紅素之檢驗方法

Method of Test for Astaxanthin in Foods in Capsule or Tablet Form

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於膠囊錠狀食品中蝦紅素(astaxanthin)之檢驗。
2. 檢驗方法：檢體經酵素水解及萃取後，以高效液相層析儀(high performance liquid chromatograph)分析之方法。
 - 2.1. 裝置：
 - 2.1.1. 高效液相層析儀：
 - 2.1.1.1. 檢出器：光二極體陣列檢出器(photodiode array detector)。
 - 2.1.1.2. 層析管：YMC Carotenoid C30，5 μm ，內徑4.6 mm $\times$ 25 cm，或同級品。
 - 2.1.2. 旋渦混合器(Vortex mixer)。
 - 2.1.3. 超音波振盪器(Ultrasonicator)。
 - 2.1.4. 水浴(Water bath)：具溫度控制，可振搖。
 - 2.1.5. 離心機(Centrifuge)：可達3000 $\times g$ 以上者。
 - 2.2. 試藥：丙酮、甲醇及甲基第三丁基醚(methyl *tert*-butyl ether)均採用液相層析級；石油醚、磷酸(85%)、鹽酸、十水合硫酸鈉($\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$)、無水硫酸鈉、三羥甲基胺基甲烷(tris(hydroxymethyl)aminomethane)及二丁基羥基甲苯(butylated hydroxytoluene, BHT)均採用試藥級；去離子水(比電阻於25 $^{\circ}\text{C}$ 可達18 $\text{M}\Omega \cdot \text{cm}$ 以上)；膽固醇酯酶(cholesterol esterase from *Pseudomonas fluorescens*, 6.25 U/mg)；全反式蝦紅素(all-*trans* astaxanthin)及酯化型蝦紅素(astaxanthin esters)對照用標準品； β -衍-8'-胡蘿蔔醛(β -apo-8'-carotenal)內部標準品。
 - 2.3. 器具及材料：
 - 2.3.1. 離心管：15 mL及50 mL，PP材質。
 - 2.3.2. 容量瓶：10 mL、25 mL及50 mL，褐色。
 - 2.3.3. 濾膜：孔徑0.22 μm ，PTFE材質。
 - 2.4. 試劑之調製：
 - 2.4.1. 含0.1% BHT之丙酮溶液：
稱取BHT 0.5 g，以丙酮溶解使成500 mL。
 - 2.4.2. 50 mM三羥甲基胺基甲烷溶液：

稱取三羥甲基胺基甲烷0.606 g，加去離子水90 mL溶解，以鹽酸調整pH值至7.0，再加去離子水使成至100 mL。

2.4.3. 膽固醇酯酶溶液：

稱取適量膽固醇酯酶，以50 mM三羥甲基胺基甲烷溶液溶解使成8 U/mL。

2.5. 移動相溶液之調製：

2.5.1. 移動相溶液A：甲醇。

2.5.2. 移動相溶液B：甲基第三丁基醚。

2.5.3. 移動相溶液C：

取磷酸11.8 mL，加去離子水使成1000 mL，經濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液C。

2.6. 內部標準溶液之配製：

取 β -衍-8'-胡蘿蔔醛內部標準品約5 mg，精確稱定，以含0.1% BHT之丙酮溶液溶解並定容至25 mL，作為內部標準原液，冷凍避光儲存。臨用時取適量內部標準原液，以含0.1% BHT之丙酮溶液稀釋至20 μ g/mL，供作內部標準溶液。

2.7. 標準溶液之配製：

取全反式蝦紅素對照用標準品約10 mg，精確稱定，以含0.1% BHT之丙酮溶液溶解並定容至10 mL，作為標準原液，冷凍避光儲存。臨用時取適量標準原液及內部標準原液混合，以含0.1% BHT之丙酮溶液稀釋至0.1~50 μ g/mL (含內部標準品濃度10 μ g/mL)，供作標準溶液。

2.8. 標準曲線之製作：

精確量取標準溶液20 μ L，注入高效液相層析儀中，依下列條件進行分析。就全反式蝦紅素與內部標準品之波峰面積比，與對應之全反式蝦紅素濃度，製作標準曲線。

高效液相層析測定條件^(註)：

光二極體陣列檢出器：定量波長：478 nm。

層析管：YMC Carotenoid C30，5 μ m，內徑4.6 mm × 25 cm。

層析管溫度：25°C。

移動相溶液：A液、B液與C液以下列條件進行梯度分析

時間	A (%)	B (%)	C (%)
0.0 → 23.0	79 → 79	17 → 17	4 → 4
23.0 → 23.5	79 → 66	17 → 30	4 → 4

23.5 → 28.0	66 → 16	30 → 80	4 → 4
28.0 → 30.0	16 → 16	80 → 80	4 → 4
30.0 → 30.1	16 → 79	80 → 17	4 → 4
30.1 → 35.0	79 → 79	17 → 17	4 → 4

移動相流速：1 mL/min。

注入量：20 µL。

註：上述測定條件分析不適時，可依所使用之儀器，設定適合之測定條件。

2.9. 檢液之調製^(註)：

將檢體均質混勻後，取約100 mg，精確稱定，粉狀檢體先以去離子水 5 mL分散，再加入含0.1% BHT之丙酮溶液40 mL；油狀檢體加入含0.1% BHT之丙酮溶液45 mL，旋渦混勻，於超音波振盪30分鐘，以含0.1% BHT之丙酮溶液定容至50 mL，以3000 ×g離心5分鐘，收集上清液。取上清液2 mL，置於15 mL離心管中，加入內部標準溶液1 mL及膽固醇酯酶溶液3 mL，旋渦混勻，37°C水浴中反應1小時，每隔15分鐘取出旋渦混勻。加入十水合硫酸鈉1 g及石油醚2 mL，旋渦混勻30秒，以3000 ×g離心3分鐘，收集上層液於含無水硫酸鈉1 g之15 mL離心管中，下層液再加入石油醚2 mL，重複上述萃取步驟直至上下層皆為無色，合併上層液，以氮氣吹乾，殘留物以含0.1% BHT之丙酮溶液 2 mL溶解，經濾膜過濾後，供作檢液。

註：檢驗需全程避光。

2.10. 鑑別試驗及含量測定：

精確量取檢液及標準溶液各20 µL，分別注入高效液相層析儀中，依2.8節條件進行分析。就檢液與標準溶液所得波峰之滯留時間及吸收圖譜比較鑑別之，並依下列計算式求出檢體中蝦紅素之含量(mg/g)^(註)：

$$\text{檢體中蝦紅素之含量(mg/g)} = \frac{C \times V}{M \times 1000}$$

C：由all-trans、9-cis及13-cis蝦紅素之波峰面積乘上其相對感應因子(分別為1.0、1.1及1.3)所得之波峰總面積，依標準曲線求得檢液中蝦紅素之濃度(µg/mL)

V：檢體定容之體積(50 mL)

M：取樣分析檢體之重量(g)

註：檢體中蝦紅素之含量，以游離型蝦紅素計。

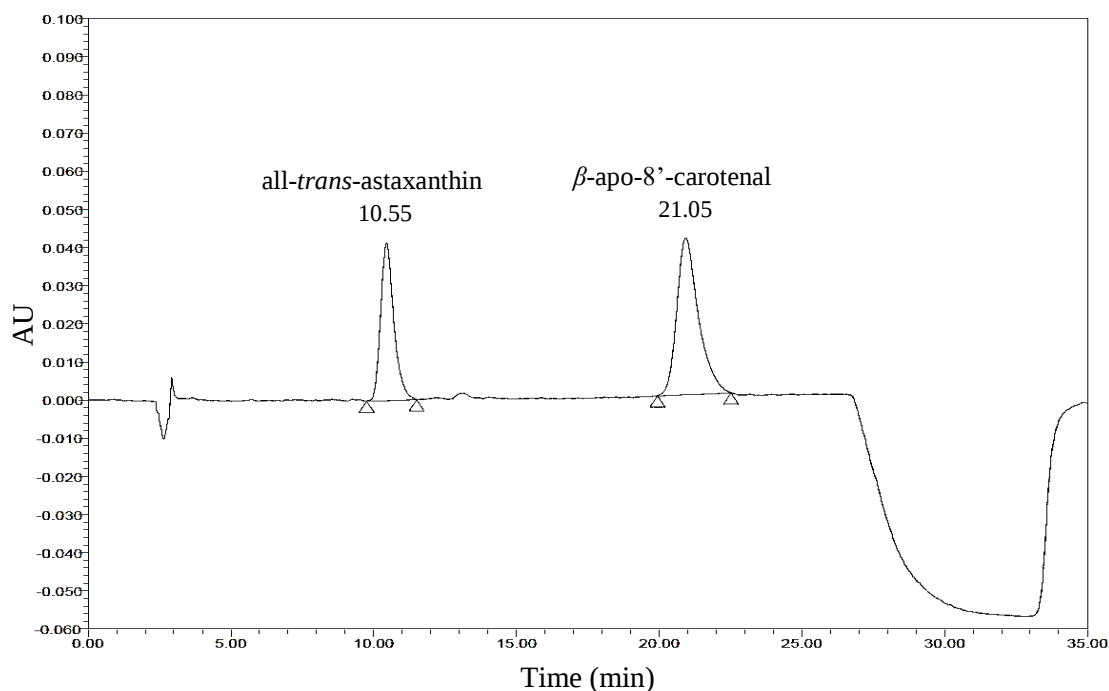
附註：1. 本檢驗方法之定量極限為0.25 mg/g。

2. 檢體中有影響檢驗結果之物質時，應自行探討。

參考文獻：

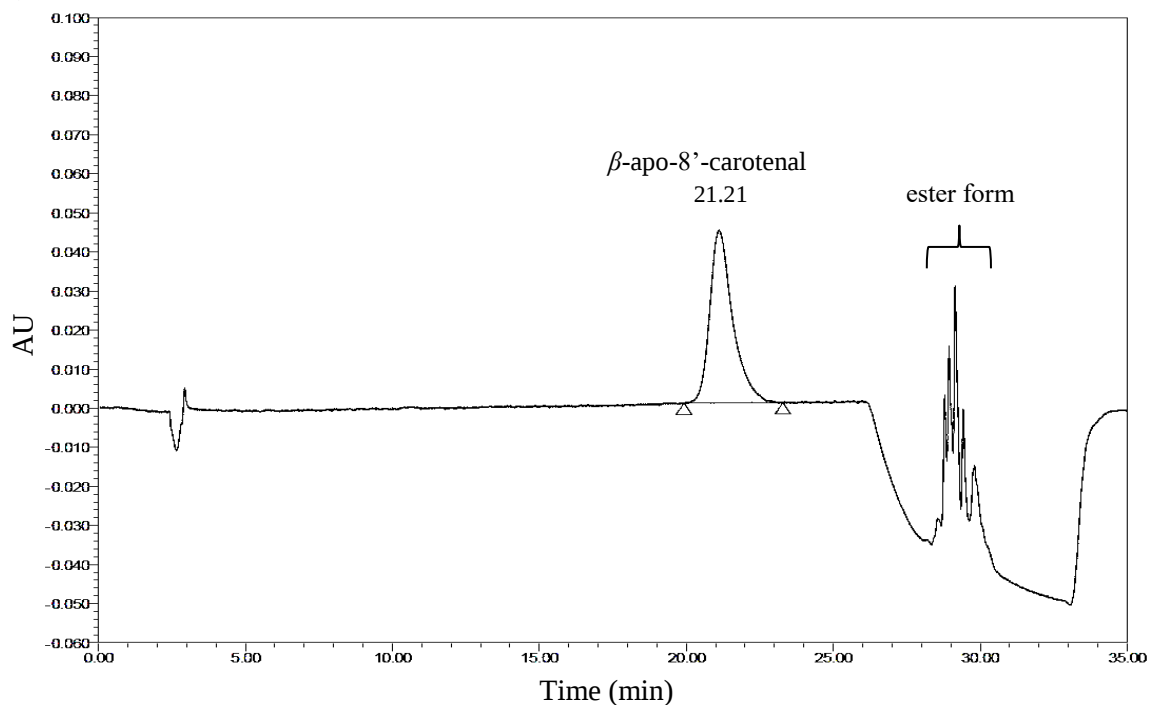
1. United States Pharmacopeial Convention, Inc. 2015. The United States Pharmacopeia 38, Dietary supplements: astaxanthin esters. pp. 5892-5893. United States Pharmacopeial Convention, Inc. Rockville, MD, USA.
2. 孔凡華、徐佳佳、郭倩、白沙沙、李東、方從容、邱楠楠、崔亞娟。2021。高效液相色譜法測定蝦青素油中蝦青素的含量。食品與發酵工業，47(6): 214-220。

參考層析圖譜

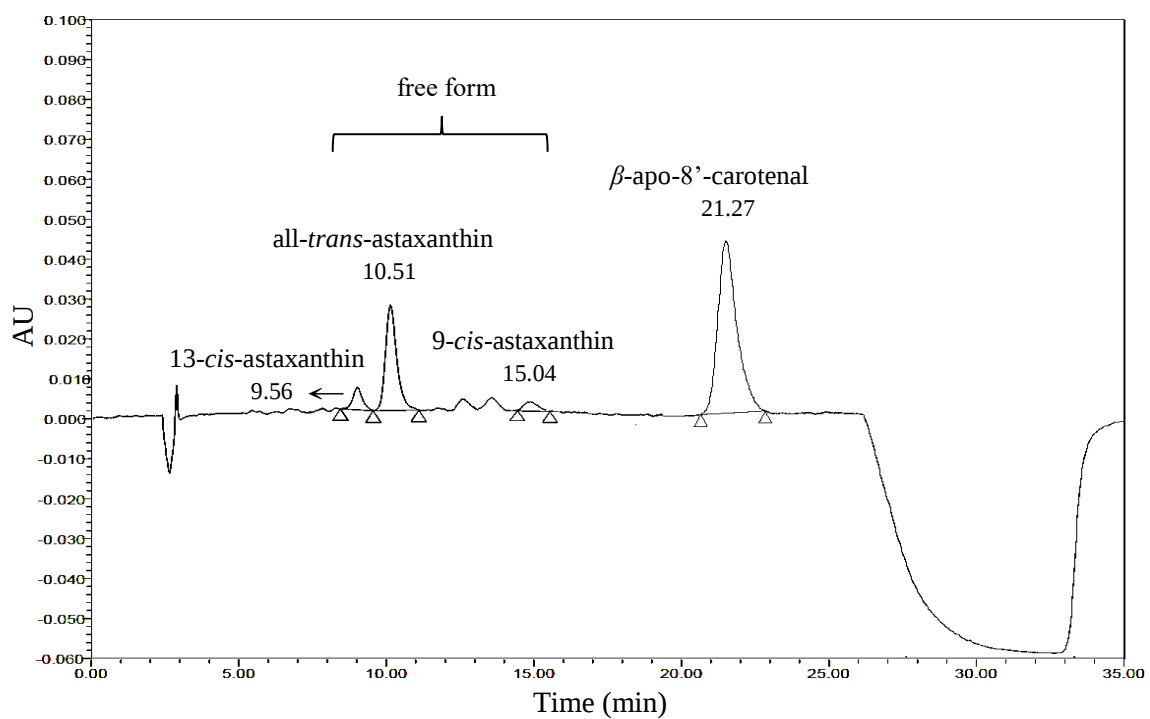


圖一、全反式蝦紅素標準品及內部標準品之HPLC圖譜

(A)



(B)



圖二、酯化型蝦紅素標準品及內部標準品未經酵素水解(A)及經酵素水解(B)之HPLC圖譜